

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年10 月28 日 (28.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/092370 A1(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, C07K 16/44, C12P
21/02, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, G01N 33/53目 1 7 番 8 5 号 日本エンバイロケミカルズ株式会
社 研究開発部内 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005250

(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044
大阪府大阪市中央区伏見町四丁目 2 番 1 4 号 藤村
大和生命ビル Osaka (JP).

(22) 国際出願日: 2004 年4 月13 日 (13.04.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-110877 2003 年4 月15 日 (15.04.2003) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本エン
バイロケミカルズ株式会社 (JAPAN ENVIROCHEM-
ICALS, LTD.) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区
道修町二丁目 3 番 8 号 Osaka (JP).(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が
可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小林 典裕
(KOBAYASHI, Norihiro) [JP/JP]; 〒6588558 兵庫県神
戸市東灘区本山北町 4 丁目 1 9 番 1 号 神戸薬科大学
内 Hyogo (JP). 郷田 泰弘 (GODA, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒
5320024 大阪府大阪市淀川区十三本町 2 丁目 1 7 番
8 5 号 日本エンバイロケミカルズ株式会社 研究
開発部内 Osaka (JP). 廣部 将人 (HIROBE, Masato)
[JP/JP]; 〒5320024 大阪府大阪市淀川区十三本町 2 丁添付公開書類:
— 国際調査報告書2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROTEIN CAPABLE OF BINDING PLASTICIZER

(54) 発明の名称: 可塑剤に対する結合能を有する蛋白質

(57) Abstract: A protein capable of binding a plasticizer, which protein has acquired useful properties such as those of, in the assay, quantitative determination or concentrating of plasticizer, exhibiting high sensitivity, less cross reactivity, resistance to influence from interfering substances and resistance to influence from solvents. In particular, a modified protein whose various properties, such as affinity for a plasticizer as antigen, antigen binding capacity, cross reactivity, tolerance to a substance interfering with an antigen-antibody reaction, tolerance to a substance interfering with an enzymatic color development reaction, resistance to a solvent, etc., have been improved by the technology of genetic manipulation.

(57) 要約: 本発明は、可塑剤の測定・定量や濃縮に際し、感度の良い、交叉反応性の少ない、妨害物質の影響を受けにくい、溶媒による影響を受けにくい等の有用な性質を付加した、可塑剤に対する結合能を有する蛋白質を提供する。具体的には、抗原としての可塑剤に対する親和性、抗原結合能、交叉反応性、抗原抗体反応妨害物質耐性、酵素発色反応妨害物質耐性、溶媒耐性等の種々の性質を遺伝子組換え技術により向上させた改変蛋白質を提供する。

明細書

可塑剤に対する結合能を有する蛋白質

技術分野

- 5 本発明は、抗可塑剤抗体、該抗体の遺伝子、該可塑剤に対する結合能を有する蛋白質の製造法、可塑剤の測定又は定量方法、可塑剤の濃縮方法等に関する。

背景技術

- 10 近年、環境中、例えば河川水又は下水中に存在する可塑剤等の環境汚染物質による環境汚染が問題となっている。従って環境中の環境汚染物質やその分解物を測定、分析して、その結果を環境保全に役立たせることが必要となる。このような測定、分析法として、幾つかの優れた方法が知られている（例えば、国際公開第WO99/43799号パンフレット及び特開2001-41958号公報を参照）。

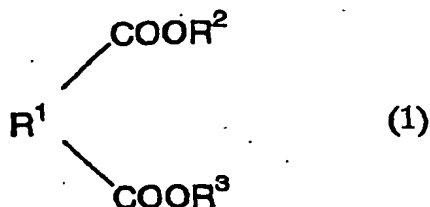
15

発明の開示

- 本発明は、可塑剤に対する抗体の遺伝子を取得し、元の抗体が持つ抗原に対する親和性、抗原結合能、交叉反応性、抗原抗体反応妨害物質耐性、酵素発色反応妨害物質耐性、溶媒耐性等の種々の性質を遺伝子操作の改変技術により作出することにより得られた改変蛋白質に、可塑剤の測定・定量や濃縮に際し、感度の良
- 20 い、交叉反応性の少ない、妨害物質の影響を受けにくい、溶媒による影響を受けにくい等の有用な性質を付加した可塑剤に対する結合能を有する蛋白質を作製し利用しようとするものである。

ここに、可塑剤としては、例えば、

- 25 式(1)：



[式中、 R^1 は o -フェニレン又はテトラメチレン、 R^2 及び R^3 は同一又は異な
 5 った、各々、 H 、炭素数1～20の直鎖又は分岐鎖（含 sec -、 tert -、 iso -）のアルキル、置換されていてもよいベンジル又は置換されていてもよ
 いシクロヘキシルを意味する。]で表される可塑剤（PP）[例、BBP（フタル酸ブチルベンジル）、DBP（フタル酸ジブチル）、DCHP（フタル酸ジシ
 クロヘキシル）、DEP（フタル酸ジエチル）、DEHP（フタル酸ジ（2-エ
 チルヘキシル））、DEHA（アジピン酸ジエチルヘキシル）、DHP（フタル
 10 酸ジヘキシル）、DPP（フタル酸ジ n -ペンチル）、DPrP（フタル酸ジ
 プロピル）、DMP（フタル酸ジメチル）、DnOP（フタル酸ジノルマルオク
 チル）、DINP（フタル酸ジイソノニル）、DNP（フタル酸ジノニル）、D
 IDP（フタル酸ジイソデシル）、DOA（アジピン酸ジオクチル）、DINA
 （アジピン酸ジイソノニル）など]が挙げられる。

「炭素数1～20の直鎖又は分岐鎖のアルキル」としては、例えばメチル、エ
 15 チル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、 sec -ブチル、 tert -ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、1-エチルプロピル、ヘキシル、
 イソヘキシル、1, 1-ジメチルブチル、2, 2-ジメチルブチル、3, 3-ジ
 メチルブチル、2-エチルブチル、ヘプチル、オクチル、2-エチルヘキシル、
 ノニル、イソノニル、デシル、イソデシルなどが挙げられる。上記「炭素数1～
 20 20の直鎖又は分岐鎖のアルキル」の「直鎖又は分岐鎖のアルキル」としては、
 なかでも炭素数1～12のアルキルが好ましく、炭素数6～10のアルキルがよ
 り好ましい。

別の局面では、「炭素数1～20の直鎖又は分岐鎖のアルキル」は、炭素数1

～20の置換されていてもよいアルキルでありうる。上記「炭素数1～20の置換されていてもよいアルキル」の「アルキル」としては、例えば、上記「炭素数1～20の直鎖又は分岐鎖のアルキル」の「アルキル」と同様のものが挙げられるが、なかでも炭素数1～12のアルキルが好ましく、炭素数4～8のアルキルがより好ましい。

「炭素数1～20の置換されていてもよいアルキル」、「置換されていてもよいシクロヘキシル」及び「置換されていてもよいベンジル」の置換基としては、例えば、炭素数1～8のアルキル（例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、1-エチルプロピル、ヘキシル、イソヘキシル、1, 1-ジメチルブチル、2, 2-ジメチルブチル、3, 3-ジメチルブチル、2-エチルブチルなど）、炭素数2～8のアルケニル（例えば、エテニル、1-プロペニル、2-プロペニル、1-メチルエテニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、1-メチル-1-プロペニル、1-メチル-2-プロペニル、2-メチル-1-プロペニルなど）、炭素数2～8のアルキニル（例えば、エチニル、1-プロピニル、2-プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、3-ブチニル、1-メチル-2-プロピニルなど）などが挙げられる。

上記「炭素数1～8のアルキル」としては、なかでも炭素数1～6のアルキルが好ましく、炭素数1～4のアルキルがより好ましい。上記「炭素数2～8のアルケニル」としては、なかでも炭素数2～6のアルケニルが好ましく、炭素数2～4のアルケニルがより好ましい。上記「炭素数2～8のアルキニル」としては、なかでも炭素数2～6のアルキニルが好ましく、炭素数2～4のアルキニルがより好ましい。なお、「炭素数1～20の置換されていてもよいアルキル」、「置換されていてもよいシクロヘキシル」、「置換されていてもよいベンジル」の置換基の数は、特に制限されないが、例えば1～3個、好ましくは1～2個、より好ましくは1個でありうる。

また、可塑剤の他の例として、DOZ（アゼライン酸ジオクチル）、ESBO（エポキシ化大豆油）、TOTM（トリメット酸トリオクチル）、DBS（セバシン酸ジブチル）、DOS（セバシン酸ジオクチル）、TCP（リン酸トリクレシル）、ATBC（アセチルクエン酸トリブチル）なども挙げることができる。

- 5 本発明者らは、親和性を向上させることにより感度良く測定可能等の有用な性質を付加した、抗可塑剤に対する結合能を有する蛋白質の取得につき鋭意検討したところ、その遺伝子もしくは改変遺伝子を含有する形質転換体を作製し、可塑剤に対する結合能を有する蛋白質を効率よく産生させることができることを見出し、さらに研究した結果、本発明を完成した。

- 10 すなわち、本発明は、

(1) 以下 (a) 又は (b) の蛋白質又はその塩：

(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列、配列番号25で表されるアミノ酸配列、若しくはこれらと実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質；

- 15 (b) 配列番号4で表わされるアミノ酸配列、配列番号27で表されるアミノ酸配列、若しくはこれらと実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質、

(2) 以下 (a1) ～ (a4)、(b1) ～ (b4) のいずれかの蛋白質又はその塩：

- (a1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において1若しくは2個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号4又は
20 配列番号27で表されるアミノ酸配列と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質；

- (a2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において1若しくは2個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号4又は
25 配列番号27で表されるアミノ酸配列において1若しくは2個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質；

(a 3) 配列番号 25 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 4 又は配列番号 27 で表されるアミノ酸配列と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質；

- 5 (a 4) 配列番号 25 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 4 又は配列番号 27 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質；

- 10 (b 1) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 2 又は配列番号 25 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質；

- 15 (b 2) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 2 又は配列番号 25 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質；

- 20 (b 3) 配列番号 27 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 2 又は配列番号 25 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質；

- 25 (b 4) 配列番号 27 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 2 又は配列番号 25 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成し

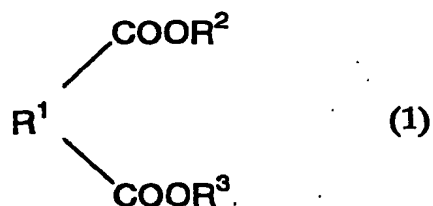
たときに可塑剤に対して結合する蛋白質、

(3) 以下 (a) 又は (b) の蛋白質又はその塩：

(a) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列、若しくはこれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質；

5 (b) 配列番号 4 で表わされるアミノ酸配列、若しくはこれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質、

(4) 可塑剤が、式 (1)：



10 [式中、 R^1 は o -フェニレン、 R^2 及び R^3 は同一又は異なって、各々、H、炭素数 1～20 の直鎖又は分枝鎖 (含 *sec*-, *tert*-, *iso*-) アルキル、置換されていてもよいベンジル又は置換されていてもよいシクロヘキシルを意味する。] で表される可塑剤である、上記 (2) 又は (3) の蛋白質、

(5) 上記 (1)～(4) のいずれかの蛋白質を遺伝子組換えする方法、

(6) 上記 (5) の方法により得られた蛋白質又はその塩、

15 (7) 上記 (1)～(4) 及び (6) のいずれかの蛋白質の部分ペプチド又はその塩、

(8) 上記 (1)～(4) 及び (6) のいずれかの蛋白質又はその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(9) 上記 (8) のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

20 (10) 上記 (9) の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(11) 上記 (1)～(4) 及び (6) のいずれかの蛋白質又はその部分ペプチド或いはそれらの塩を産生せしめ、これを採取することを特徴とする、上記

(1)～(4) 及び (6) のいずれかの蛋白質又はその部分ペプチド或いはそれ

らの塩の製造法、

(12) 以下 (a) 及び (b) が連結してなる複合体：

(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列、配列番号25で表されるアミノ酸配列、若しくはこれらと実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質；

5 (b) 配列番号4で表わされるアミノ酸配列、配列番号27で表されるアミノ酸配列、若しくはこれらと実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質、

(13) 上記(12)の複合体を使用することを特徴とする、該複合体に結合する可塑剤を同定する方法、

10 (14) 上記(12)の複合体を使用することを特徴とする、可塑剤の測定又は定量方法、

(15) 上記(12)の複合体を含む、可塑剤の測定又は定量用キット、

(16) 上記(12)の複合体を使用することを特徴とする、可塑剤の濃縮方法、

(17) 上記(12)の複合体を含む、可塑剤の濃縮用キット、

などである。

15

図面の簡単な説明

図1は、抗可塑剤抗体(DH-150)重鎖の塩基配列及びアミノ酸配列を示す。

図2は、抗可塑剤抗体(DH-150)軽鎖の塩基配列及びアミノ酸配列を示す。

20

図3は、抗可塑剤抗体(DH-150)重鎖及び軽鎖を有する単鎖抗体遺伝子のアガロースゲル電気泳動を示す。

図4は、抗可塑剤抗体(DF-34)重鎖の塩基配列及びアミノ酸配列を示す。

図5は、抗可塑剤抗体(DH-34)軽鎖の塩基配列及びアミノ酸配列を示す。

25

図6は、抗可塑剤抗体(DH-150、DH-34)重鎖の塩基配列及びアミノ酸配列の比較を示す。

図7は、抗可塑剤抗体（DH-150、DH-34）軽鎖の塩基配列及びアミノ酸配列の比較を示す。

発明の詳細な説明

- 5 本発明は、配列番号2で表わされるアミノ酸配列、配列番号25で表されるアミノ酸配列、配列番号4で表わされるアミノ酸配列、配列番号27で表されるアミノ酸配列、若しくはこれらと実質的に同一のアミノ酸配列を有する（又は、かなる）蛋白質を提供する。

- 一実施態様では、配列番号2で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質は、上記（a1）及び（a2）の蛋白質、並びに、（a5）配列番号：2で表されるアミノ酸配列のうち、1以上の特定領域に相当するアミノ酸配列が、可塑剤に対する他の抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列（例えば、配列番号25で表されるアミノ酸配列）に含まれる同じ種類の1以上の特定領域に相当するアミノ酸配列と交換されているアミノ酸配列を有する（又は、かなる）蛋白質、或いはこのアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する（又は、かなる）蛋白質でありうる。（a5）の蛋白質のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質としては、例えば、（a5）の蛋白質のアミノ酸配列において1若しくは2個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ（b）の蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質が挙げられる。

- 別の実施態様では、配列番号25で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質は、上記（a3）及び（a4）の蛋白質、並びに、（a6）配列番号25で表されるアミノ酸配列のうち、1以上の特定領域に相当するアミノ酸配列が、可塑剤に対する他の抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列（例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列）に含まれる同じ種類の1以上の特定領域に相当するアミノ酸配列と交換されているアミノ酸配列を有する（又は、

からなる) 蛋白質、或いはこのアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する (又は、からなる) 蛋白質でありうる。(a 6) の蛋白質のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質としては、例えば、(a 6) の蛋白質のアミノ酸配列において1若しくは2個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは
5 付加されたアミノ酸配列を有し、かつ (b) の蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質が挙げられる。

上記 (a 5)、(a 6) における特定領域としては、相補性決定領域1、相補性決定領域2、相補性決定領域3 (以下、必要に応じてCDR1、CDR2、CDR3と省略)、フレームワーク領域1、フレームワーク領域2、フレームワーク領域3、フレームワーク領域4 (以下、必要に応じてFR1、FR2、FR3、FR4と省略) が挙げられる。上記 (a 5)、(a 6) では、交換の対象となるアミノ酸配列は、好ましくは、同じ種類の特定領域のアミノ酸配列である。また、交換される特定領域の数は、1以上であれば特に限定されないが、例えば1~3
10 個、好ましくは1~2個、より好ましくは1個である。アミノ酸配列の交換は、自体公知の方法によって行なうことができる。具体的には、各領域のN、C両末端に対応するプライマーに対し交換する領域に対応した部分を繋いだようなプライマーを設計し、このプライマーを用いて断片をPCRにて増幅した後、改めて交換した組合せでPCRを行えばよい。

配列番号2で表されるアミノ酸配列においてCDR1、CDR2、CDR3、FR1、FR2、FR3、FR4に相当する領域は、具体的には、以下の通りである：

- (i) CDR1 (配列番号2で表されるアミノ酸配列における31番目から35番目までのアミノ酸残基) ；
- (ii) CDR2 (配列番号2で表されるアミノ酸配列における50番目から66
25 番目までのアミノ酸残基) ；
- (iii) CDR3 (配列番号2で表されるアミノ酸配列における99番目から11

0番目までのアミノ酸残基) ;

(iv) FR 1 (配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における 1 番目から 3 0 番目までのアミノ酸残基) ;

5 (v) FR 2 (配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における 3 6 番目から 4 9 番目までのアミノ酸残基) ;

(vi) FR 3 (配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における 6 7 番目から 9 8 番目までのアミノ酸残基) ;

(vii) FR 4 (配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における 1 1 1 番目から 1 2 1 番目までのアミノ酸残基) 。

10 また、配列番号 2 5 で表されるアミノ酸配列において CDR 1、CDR 2、CDR 3、FR 1、FR 2、FR 3、FR 4 に相当する領域は、具体的には、以下の通りである :

(i) CDR 1 (配列番号 2 5 で表されるアミノ酸配列における 3 1 番目から 3 6 番目までのアミノ酸残基) ;

15 (ii) CDR 2 (配列番号 2 5 で表されるアミノ酸配列における 5 1 番目から 6 6 番目までのアミノ酸残基) ;

(iii) CDR 3 (配列番号 2 5 で表されるアミノ酸配列における 9 9 番目から 1 0 5 番目までのアミノ酸残基) ;

20 (iv) FR 1 (配列番号 2 5 で表されるアミノ酸配列における 1 番目から 3 0 番目までのアミノ酸残基) ;

(v) FR 2 (配列番号 2 5 で表されるアミノ酸配列における 3 7 番目から 5 0 番目までのアミノ酸残基) ;

(vi) FR 3 (配列番号 2 5 で表されるアミノ酸配列における 6 7 番目から 9 8 番目までのアミノ酸残基) ;

25 (vii) FR 4 (配列番号 2 5 で表されるアミノ酸配列における 1 0 6 番目から 1 1 6 番目までのアミノ酸残基) 。

また、別の実施態様では、上記（a）の蛋白質は、例えば、配列番号 2 又は配列番号 25 で表されるアミノ酸配列、又は上記（a 5）若しくは（a 6）の蛋白質のアミノ酸配列に対して有意な相同性を有するアミノ酸配列を有し、かつ

- 5 （b）の蛋白質のアミノ酸配列に対して有意な相同性を有するアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質でありうる。

- 一実施態様では、配列番号 4 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質は、上記（b 1）及び（b 2）の蛋白質、並びに、（b 5）配列番号 4 で表されるアミノ酸配列のうち、1 以上の特定領域に相当するアミノ酸配列が、可塑剤に対する他の抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列（例えば、配列番号 27 で表されるアミノ酸配列）に含まれる同じ種類の 1 以上の特定領域に相当するアミノ酸配列と交換されているアミノ酸配列を有する（又は、からなる）蛋白質、或いはこのアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する（又は、からなる）蛋白質でありうる。（b 5）の蛋白質のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質としては、例えば、（b 5）の蛋白質のアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ（a）の蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質が挙げられる。
- 10
- 15

- 別の実施態様では、配列番号 27 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質は、上記（b 3）及び（b 4）の蛋白質、並びに、（b 6）配列番号 27 で表されるアミノ酸配列のうち、1 以上の特定領域に相当するアミノ酸配列が、可塑剤に対する他の抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列（例えば、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列）に含まれる同じ種類の 1 以上の特定領域に相当するアミノ酸配列と交換されているアミノ酸配列を有する（又は、からなる）蛋白質、或いはこのアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する（又は、からなる）蛋白質でありうる。（b 6）の蛋白質のアミノ酸配列と
- 20
- 25

実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質としては、例えば、(b 6) の蛋白質のアミノ酸配列において1若しくは2個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ(a) の蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質が挙げられる。

- 5 上記(b 5)、(b 6)における特定領域としては、CDR 1、CDR 2、CDR 3、FR 1、FR 2、FR 3、FR 4が挙げられる。上記(b 5)、(b 6)では、交換の対象となるアミノ酸配列は、好ましくは、同じ種類の特定領域のアミノ酸配列である。また、交換される特定領域の数は、1以上であれば特に限定されないが、例えば1～3個、好ましくは1～2個、より好ましくは1個である。
- 10 アミノ酸配列の交換は、自体公知の方法によって行なうことができる。具体的には、各領域のN、C両末端に対応するプライマーに対し交換する領域に対応した部分を繋いだようなプライマーを設計し、このプライマーを用いて断片をPCRにて増幅した後、改めて交換した組合せでPCRを行えばよい。

- 配列番号4で表されるアミノ酸配列においてCDR 1、CDR 2、CDR 3、FR 1、FR 2、FR 3、FR 4に相当する領域は、具体的には、以下の通りである：
- 15

- (i) CDR 1 (配列番号4で表されるアミノ酸配列における24番目から34番目までのアミノ酸残基) ；
- (ii) CDR 2 (配列番号4で表されるアミノ酸配列における50番目から56番目までのアミノ酸残基) ；
- 20 (iii) CDR 3 (配列番号4で表されるアミノ酸配列における89番目から96番目までのアミノ酸残基) ；
- (iv) FR 1 (配列番号4で表されるアミノ酸配列における1番目から23番目までのアミノ酸残基) ；
- 25 (v) FR 2 (配列番号4で表されるアミノ酸配列における35番目から49番目までのアミノ酸残基) ；

(vi) FR 3 (配列番号 4 で表されるアミノ酸配列における 57 番目から 88 番目までのアミノ酸残基) ;

(vii) FR 4 (配列番号 4 で表されるアミノ酸配列における 97 番目から 106 番目までのアミノ酸残基) 。

5 また、配列番号 27 で表されるアミノ酸配列において CDR 1、CDR 2、CDR 3、FR 1、FR 2、FR 3、FR 4 に相当する領域は、具体的には、以下の通りである :

(i) CDR 1 (配列番号 27 で表されるアミノ酸配列における 24 番目から 35 番目までのアミノ酸残基) ;

10 (ii) CDR 2 (配列番号 27 で表されるアミノ酸配列における 51 番目から 57 番目までのアミノ酸残基) ;

(iii) CDR 3 (配列番号 27 で表されるアミノ酸配列における 90 番目から 98 番目までのアミノ酸残基) ;

15 (iv) FR 1 (配列番号 27 で表されるアミノ酸配列における 1 番目から 23 番目までのアミノ酸残基) ;

(v) FR 2 (配列番号 27 で表されるアミノ酸配列における 36 番目から 50 番目までのアミノ酸残基) ;

(vi) FR 3 (配列番号 27 で表されるアミノ酸配列における 58 番目から 89 番目までのアミノ酸残基) ;

20 (vii) FR 4 (配列番号 27 で表されるアミノ酸配列における 99 番目から 108 番目までのアミノ酸残基) 。

また、別の実施態様では、上記 (b) の蛋白質は、例えば、配列番号 4 又は配列番号 25 で表されるアミノ酸配列、又は上記 (b 5) 若しくは (b 6) の蛋白質のアミノ酸配列に対して有意な相同性を有するアミノ酸配列を有し、かつ

25 (a) の蛋白質のアミノ酸配列に対して有意な相同性を有するアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質でありうる。

本発明において、任意の配列番号Xで表されるアミノ酸配列において欠失、置換若しくは付加されるアミノ酸の数としては、1若しくは2個以上であれば特に限定されないが、例えば1～80個、好ましくは1～20個程度、より好ましくは1～9個程度、さらにより好ましくは1～5個、最も好ましくは数個（1又は2個）でありうる。

本発明において、アミノ酸の置換としては、特定のアミノ酸が他の任意のアミノ酸で置換される限り特に限定されないが、例えば、保存的アミノ酸置換、非保存的アミノ酸置換であってもよい。「保存的アミノ酸置換」とは、特定のアミノ酸を、そのアミノ酸の側鎖と同様の性質の側鎖を有するアミノ酸で置換することをいう。具体的には、保存的アミノ酸置換では、特定のアミノ酸は、そのアミノ酸と同じグループに属する他のアミノ酸により置換される。一方、「非保存的アミノ酸置換」とは、特定のアミノ酸を、そのアミノ酸の側鎖と異なる性質の側鎖を有するアミノ酸で置換することをいう。具体的には、非保存的アミノ酸置換では、特定のアミノ酸は、そのアミノ酸と異なるグループに属する他のアミノ酸により置換される。同様の性質の側鎖を有するアミノ酸のグループは、当該分野で公知である。例えば、このようなアミノ酸のグループとしては、塩基性（即ち、正に荷電している）側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性（即ち、負に荷電している）側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、中性（即ち、荷電していない）側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）が挙げられる。また、中性側鎖を有するアミノ酸は、さらに、極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、及び非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）に分類す

することもできる。また、他のグループとして、例えば、芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）、水酸基（アルコール性水酸基、フェノール性水酸基）を含む側鎖を有するアミノ酸（例えば、セリン、トレオニン、チロシン）なども挙げることができる。

- 5 また、任意の配列番号Xで表されるアミノ酸配列に対して有意な相同性を有するアミノ酸配列としては、任意の配列番号Xで表されるアミノ酸配列に対して、例えば約40%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約80%以上、さらにより好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列が挙げられる。
- 10 相同性の程度(%)は、自体公知の方法によって決定することができる。例えば、相同性の程度(%)は、Smith及びWatermanのアルゴリズム(Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489)を採用しているGapプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix (登録商標), Genetics Computer Group, University Research Park, Madison WI)を初期設定で使用するこ
- 15 によって決定することができる。また、Karlin及びAltschulのアルゴリズム(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87:2264-2268, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90:5873-5877)を採用しているBLASTプログラムを用いてもよい。例えば、蛋白質の相同性を比較する場合、XBLASTプログラムを初期設定で使用するこ
- 20 によって、相同性の程度(%)を決定することができる。さらに、Myers及びMiller(CABIOS, 1988, 4:11-17)のアルゴリズムを採用しているALIGNプログラム(version 2.0) (GCG sequence alignment software packageの一部)を用いてもよい。ALIGNプログラムを用いてアミノ酸配列を比較する際の設定としては、例えば、PAM120 weight residue table, gap length penalty = 12, gap penalty = 4が挙げられる。また、塩基配列の相同性の程度(%)を決定する場
- 25 合にも同様に、これらのプログラムを用いることができる。

「複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する」とは、複合体が可塑剤に

対して反応性を有することを意味する。可塑剤としては、例えば、上述したものが挙げられる。複合体が可塑剤に対して結合能を有するか否かは、自体公知の方法若しくはそれに準じる方法によって決定することができる。なお、本発明の複合体は、上記可塑剤のいずれかに対する結合能を有すればよい。

- 5 配列番号 2 又は配列番号 25 で表されるアミノ酸配列、配列番号 4 又は配列番号 27 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質、並びに (a5)、(a6)、(b5)、(b6) の蛋白質に 1 以上のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を導入することにより、可塑剤に対する結合能や交叉反応性が変化した蛋白質を得ることができる。1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加される領域は、CD
- 10 R1、CDR2、CDR3、FR1、FR2、FR3、FR4 からなる群より選択される任意の 1 以上の領域でありうる。

- 本発明の部分ペプチドとしては、上記 (a) 又は (b) の蛋白質の一部を構成するペプチドであれば特に限定されないが、例えば、上記 (a) 又は上記 (b) の蛋白質のアミノ酸配列において、少なくとも 6 個以上、好ましくは少なくとも
- 15 8 個以上、より好ましくは少なくとも 10 個以上、さらにより好ましくは少なくとも 12 個以上、最も好ましくは少なくとも 15 個以上の連続するアミノ酸からなるペプチドが用いられる。また、本発明の部分ペプチドとして、上記 (a) の蛋白質、又は上記 (b) の蛋白質の CDR1、CDR2、CDR3、FR1、FR2、FR3、FR4 に相当するアミノ酸配列を有する (又は、からなる) 部分
- 20 ペプチドを用いることもできる。

- 本発明のタンパク質又はその部分ペプチドの塩としては、自体公知の塩、例えば、酸付加塩などを用いることができる。酸付加塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン
- 25 酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸) との塩などが用いられる。

本発明において「複合体」としては、上記（a）の蛋白質と上記（b）の蛋白質とが連結している限り特に限定されないが、例えば、上記（a）の蛋白質と上記（b）の蛋白質とがリンカーを介して又は介さずに共有結合している複合体が挙げられる。また、複合体は、上記蛋白質、部分ペプチドと同様に塩の形態（好ましくは、酸付加塩）で用いることもできる。

上記（a）の蛋白質と上記（b）の蛋白質とを融合させるために用いられるリンカーとしては、当該分野で公知のものを用いることができ特に限定されないが、例えば、GGGGS（配列番号34）の繰り返し配列（例えば、GGGSGGGSGGGGS（配列番号5））、GSTSGSGKSSEGGK（配列番号6）、GSTSGSGKSSEGGSGSTKG（配列番号7）、GSTSGKPSEGGK（配列番号8）、GSTSGSGKPGSGEGSTKG（配列番号9）等のペプチドなどをリンカーとして用いることができる（例えば、Production of single-chain Fv monomers and multimers, D. Filpula, J. McGuire, and M. Whitlow. In "Antibody Engineering" Edited by J. McCafferty, H. R. Hoogenboon, and D. J. Chiswell. p.253-268, IRL PRESS (1996)参照）。上記（a）の蛋白質と上記（b）の蛋白質とがリンカーを介して又は介さずに共有結合している複合体は、例えば、上記（a）の蛋白質と上記（b）の蛋白質を別々に調製した後、これら蛋白質をそれぞれリンカーに共有結合させることにより、又はリンカーを介さずに直接共有結合させることによって得ることができる。しかし、この方法では複合体を得るために、上記（a）の蛋白質及び上記（b）の蛋白質の調製後にさらに両者を連結する工程を必要とするため煩雑である。また、共有結合部位が異なるものが複数得られるおそれがあり、再現性等の観点から好ましい単一な複合体を調製しにくいという問題もある。従って、本発明の複合体としては、例えば、上記（a）の蛋白質及び上記（b）の蛋白質がペプチドリンカーを介してアミド結合することにより又は直接アミド結合することにより融合している単鎖抗体が好ましい。単鎖抗体は、上記（a）の蛋白質をコードする塩基配列と、ペプチドリンカーをコードする塩基配列と（リンカーを介してアミド

結合している単鎖抗体を得る場合)、上記(b)の蛋白質をコードする塩基配列とを読み枠を合わせて含む発現ベクターを含有する形質転換体から容易に調製できるため有用である。なお、ペプチドリンカーをコードする塩基配列は、上記(a)及び(b)の蛋白質をコードする塩基配列と読み枠を合わせたときに終止コドンを含まないものであれば特に限定されない。

ペプチドリンカーは、当該分野で公知の方法により適宜選択することができる。具体的には、ペプチドリンカーとしては、1個以上のアミノ酸残基からなる任意の長さのペプチドを用いることができるが、例えば10個以上のアミノ酸残基からなるペプチドが用いられる。

- 10 本発明はまた、本発明の蛋白質のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチドは、前述した本発明の蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであれば如何なるものであってもよい。

- 具体的には、本発明のポリヌクレオチドとしては、上記(a)の蛋白質をコードする塩基配列(例えば、配列番号1で表される塩基配列)、上記(b)の蛋白質をコードする塩基配列(例えば、配列番号3で表される塩基配列)、上記単鎖抗体をコードする塩基配列が挙げられる。また、本発明のポリヌクレオチドとして、本発明の蛋白質を遺伝子組換えして得られた蛋白質をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを挙げることできる。

- 上述した本発明のポリヌクレオチドは、本明細書の開示に基づき公知の方法を用いて得ることができる。例えば、限定されるわけではないが、本発明のポリヌクレオチドは、抗可塑剤モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマより得ることができる。抗体蛋白のN末端アミノ酸配列を決定し、ついで、このアミノ酸配列より推定した塩基配列を持つプライマーを作成し、抗体産生ハイブリドーマより公知の方法によりmRNAを調製し、それを基に逆転写酵素により一本鎖cDNAを合成後、本明細書に開示された抗可塑剤モノクローナル抗体の重鎖又は軽鎖の可変領域のアミノ酸配列又は塩基配列に基づき、PCR法、ハイブリダイ

ゼーション法等を用いることによって、本発明のポリヌクレオチドを選択的に得ることが可能である。このような方法は周知であり、当業者は本明細書の開示に基づいて、本発明のポリヌクレオチドを容易に単離することが可能である。これらの方法の具体的操作方法としては、例えば、たとえば、モレキュラー・クロー

5 ニング (Molecular Cloning) 3rd edition (J. Sambrook et. al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001) に記載の方法などが挙げられる。また、mRNA の抽出はアマシャム社の QuickPrep mRNA 精製キットの操作説明書に記載の方法で、cDNA の合成や 5' -RACE 法はクロンテック社の SMART RACE キットの操作説明書に記載の方法なども挙げられる。

- 10 一実施態様では、本発明の複合体は組換え抗体（その断片をも含む）であり得る。組換え抗体 (Recombinant Antibodies) の作製方法などについては、RECOMBINANT ANTIBODIES (ed. by F. Breitling, John Wiley & Sons (USA), 1999) の第 2 章に、組換え抗体断片 (Recombinant Antibody Fragments) の作製方法、ハイブリドーマ細胞 (Hybridoma Cell Line) からの抗体遺伝子のクローニング
- 15 (Cloning) 方法、抗体遺伝子ライブラリー (Antibody Gene Libraries) の作製方法、遺伝子ライブラリーからの組換え抗体の選択 (Selection of Recombinant Antibodies From Gene Libraries) 方法、抗体の遺伝子操作 (Antibody Engineering) 方法などが記載されており、これらの方法により組換え抗体の作製が可能である。
- 20 また、同書第 4 章には、組換え抗体の製造方法も記載されており in vitro ではウサギ Reticulocyte lysate での発現が、原核生物 (Prokaryote) では、大腸菌 (E. coli) の Cytoplasm、periplasm の soluble fraction、periplasm の inclusion body や、Bacillus、Streptomyces での発現が、真核生物 (Eukaryote) では、Pichia、Saccharomyces、Schizosaccharomyces 等の酵母、
- 25 Trichoderma などのカビ、昆虫細胞では Baculovirus、myeloma、CHO、COS 等の動物細胞、タバコなどの transgenic 植物、transgenic 動物などでの発現方法が

記載されており、これらにより形質転換体の作製が可能である。

さらに、同書第4章には、組換え抗体の精製方法も記載されており、まず、物理的な方法、例えば、組換え生物の遠心分離による集菌、超音波などによる細胞破碎、機械的な磨砕や酵素的な溶菌で目的物を分離する。次にイオン交換クロマ

- 5 トグラフィー、size exclusion chromatography、thiophilic adsorption chromatography、affinity chromatographyなどを組み合わせて精製する。特に affinity chromatography は効率的な方法であり、抗原認識特異性を活用した antigen-specific methods や、protein A や protein G などの Fc 部位や Fab' 部位への結合を利用した antibody-specific method や、そのような部位を持たない scFv の場合に tag と言われる小さなペプチド断片を持った融合抗体として発
- 10 現させ、この tag に特異的な affinity カラムを使用する方法（例 His-tag、c-myc tag、Strep tag など）などにより精製することにより製造することが可能である。

- まず、抗可塑剤モノクローナル抗体産生細胞の cDNA ライブラリーを構築し、
- 15 保存性の高い免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の定常領域や可変領域の N 末端配列等をコードする cDNA をプローブに用いて、当該 cDNA ライブラリーをスクリーニングして抗可塑剤モノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖の cDNA の単離を行うことができる。これらの方法の具体的操作方法としては、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 3rd edition (J. Sambrook
- 20 et. al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001) に記載の方法などが挙げられる。

本発明のポリヌクレオチドは、また、本明細書の記載の配列に基づき、周知の技術を用いて化学的に合成してもよい。

本発明の蛋白質を遺伝子組換えする方法としては、自体公知の方法が挙げられ、例えば、その蛋白質をコードする塩基配列を変換する方法を用いることができる。

- 25 ポリヌクレオチド（例えば、DNA）の塩基配列の変換は、PCR や公知のキット、例えば、MutanTM-Super Express Km（宝酒造（株））、MutanTM-K（宝酒造

(株)) 等を用いて、ODA-LAPCR 法や Gapped duplex 法や Kunkel 法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行うことができる。クローン化された抗体蛋白質をコードする DNA は目的によりそのまま、又は所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該 DNA は

5 その 5' 末端側に翻訳開始コドンとしての ATG を有し、また 3' 末端側には翻訳終止コドンとしての TAA、TGA 又は TAG を有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成 DNA アダプターを用いて付加することもできる。本発明の抗体蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明の抗体蛋白質をコードする DNA から目的とする DNA 断片を切り出し、(ロ)

10 該 DNA 断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

組換え抗体 (Recombinant Antibody) の作製方法

組換え抗体としては、種々の形態のものが作製できるが、Roland Kontermann の ANTIBODY ENGINEERING HOME PAGE (<http://aximtl1.imt.uni-marburg.de/rek/AEP.html>、2002 年 2 月 25 日) に記載のものはその例であり、

15 例えば、Fab' fragments、F(ab') fragments、Fv fragments (Fv)、single-chain Fv fragments (scFv)、bispecific-chimeric scFV (χ -scFv)、tandem scFV (scFv)2、bispecific-(scFv)2、disulfide-linked scFv、disulfide-stabilized Fv fragments(dsFv)、diabody、single-chain diabody (scDb)、

20 bivalent diabody、bispecific diabody、knob-into-hole stabilized diabody、disulfide-stabilized diabody、triabody、tetrabody、trispecific triabody、CL-dimerized scFv、CH1-CL-dimerized scFv、CH3-dimerized scFv、knob-into-hole CH3-dimerized scFv、CH3-dimerized bivalent diabody、Fc-dimerized scFv、Fab-scFv fusions、Ig-scFv fusions、leucine-zipper stabilized scFv

25 dimers、helix-stabilized scFv dimers、4 helix-bundle stabilized scFv tetramers、streptavidin-scFv、intrabody などが組換え抗体として作製可能で

ある。

また、変異処理を施した抗体遺伝子のシャッフリング(Shuffling)により、目的の有用な性質を有する抗体を選択する方法も本発明の範囲内に入る。

組換え抗体の発現系

- 5 組換え抗体の発現系としては、効率よく組換え抗体を発現できる系であればどのような発現系でもよいが、Roland Kontermann の ANTIBODY ENGINEERING HOME PAGE (<http://aximtl.imt.uni-marburg.de/~rek/AEP.html>, 2002 年 2 月 25 日) に纏められているように、例えば、mammalian cells では、Fv、scFv や scFv derivatives、bivalent 及び bispecific scFv、scFv 又は Fab-fusion proteins、
- 10 intrabodies などの発現が、Insect cells では、scFv や Fab などの発現が、Fungal cells では、Fv、scFv や Fab などの発現が、Plants cells では、scFv の発現が知られており、このように種々の発現系が使用可能である。

cDNAライブラリーの作製法

- cDNAライブラリーの作製法としては、効率よく cDNAライブラリーを作
- 15 製できる方法であればどのような方法でも良いが、Roland Kontermann の ANTIBODY ENGINEERING HOME PAGE (<http://aximtl.imt.uni-marburg.de/~rek/AEP.html>, 2002 年 2 月 25 日) に述べられているファージディスプレイ法も、その一つである。

組換え抗体の選択方法

- 20 作製したライブラリーから、目的の組換え抗体を選択する方法としては、Roland Kontermann の ANTIBODY ENGINEERING HOME PAGE (<http://aximtl.imt.uni-marburg.de/~rek/AEP.html>, 2002 年 2 月 25 日) に記載のプロトコル、「ファージミドライブラリーからの組換え抗体の単離法」や、「fd ファージライブラリーからのペプチドの単離法」などの方法も、選択方法
- 25 として使用可能である。

ポリヌクレオチド (例えば、DNA) は、目的によりそのまま、又は、所望に

より切断、又は他のポリヌクレオチドの付加などして使用することができる。例えば、DNAは、その末端に翻訳開始コドンATGを有していてもよい。このような改変は、自体公知の方法により、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 3rd edition (J.Sambrook et. al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001)に記載の方法等により行なうことができる。

このようにして得られたDNAを、プロモーター、翻訳開始コドン、適当なシグナル配列等を自体公知の方法でベクターに組込むことにより、組換えベクターを製造することができる。該ベクターやプロモーターや宿主菌株としては、たとえば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 第3版 (J.Sambrook et.al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001)のAppendix3に記載のベクター、プロモーターやエシェリヒア属菌株等が挙げられる。

ベクターとしては、上記以外に、大腸菌由来のプラスミド (pET-276, pCANTAB-5E, pUC19, pT7Blue T.)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来のプラスミド (例、pSH19、pSH15)、 λ ファージ、M13K07などのバクテリ

15 オファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、p cDNAI/Neoなどが用いられる。

プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでも良い。例えば、宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプ

25 ロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が動物細胞である場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプ

ロモーター、HSV-TKプロモーターなど、宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

5 発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製起点などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、アンピシリン耐性遺伝子（以下Amp^Rと略称する場合がある）、カナマイシン耐性遺伝子（以下Km^Rと略称する場合がある）、クロラムフェニコール耐性遺伝子（以下Cm^Rと略称する場合がある）等が挙げられる。

10 また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明の抗体蛋白質のN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、phoA・シグナル配列、ompA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築された本発明の抗体蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

20 宿主としては、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌としては、例えばエシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、60巻、160 (1968)]、JM103 [ヌクレイック・アシッズ・リサーチ、(nucleic Acids Research)、9巻、309 (1981)]、JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)]、120巻、517 (1978)]、HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー、41巻、459 (19

69)], C600 [ジェネティクス(Genetics), 39巻, 440 (1954)], BL21DE3 (pLysS), TG-1, JM109などが用いられる。バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ズブチリス (Bacillus subtilis) MI114 [ジーン(Gene), 24巻, 255 (1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(Journal of Biochemistry), 95巻, 87 (1984)] などが用いられる。酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, シゾサッカロマイセス・ポンベ(Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913, NCYC2036、ピキア・パストリス(Pichia pastoris)などが用いられる。昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five™細胞、Mamestrabrassicae由来の細胞又はEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞(ATCC CRL1711)、Sf21細胞(以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ビボ(In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる[前田ら、ネイチャー(Nature), 315巻, 592 (1985)]。動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO, マウスL細胞、マウスAtT-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシーズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110 (1972) やジーン(Gene), 17巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行うことができる。パチ

ルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) , 168巻、111 (1979) などに記載の方法に従って行うことができる。酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) , 194巻、182-187 (1991)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシーズ・オブ・ザ・ユーエスエー

(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 75巻、1929 (1978) などに記載の方法に従って行うことができる。昆虫細胞又は昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー (Bio/Technology) , 6巻、47-55 (1988) などに記載の方法に従って行うことができる。動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコール、263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology) , 52巻、456 (1973) に記載の方法に従って行うことができる。このようにして、抗体蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。

さらに、このようにして得られた形質転換体を培養することにより、本発明の蛋白質を生成せしめ、これを採取することにより本発明の蛋白質を製造することができる。

培養に用いられる培地としては、宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培地に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機又は有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、成長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

- エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller) , ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics) , 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1972)] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 β -インドリルアクリル酸やイソプロピルチオガラクトシド (IPTG) のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行い、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 77巻, 4505 (1980)] や、0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 81巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20~35℃で約24~72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。
- 20 宿主が昆虫細胞又は昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature) , 195, 788 (1962)) に非働化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science) , 122巻, 501 (19
- 25

5 2)] , DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology) , 8巻、396 (1959)] , RPMI 1640培地 [ザ・ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) , 199巻、519 (1967)] , 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティー・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine) , 73巻、1 (1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜又は細胞外に本発明の抗体

10 蛋白質を生成せしめることができる。

このようにして得られた培養物から、目的とする本発明の抗体蛋白質を分離精製するには、例えば下記の方法により行うことができる。本発明の抗体蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチーム及び/又は凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により抗体蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100™などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に抗体蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。この

15 ようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる抗体蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行うことができる。これら公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性

20 25 を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する

方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などを用いて分離精製できる。

本発明の複合体、蛋白質、部分ペプチド及び／又はそれらの塩は、自体公知の蛋白質の合成法に従って、あるいは本発明の蛋白質を適当なプロテアーゼで切断

5 することによって製造することができる。蛋白質の合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。即ち、本発明の蛋白質を構成する部分ペプチド若しくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、精製物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的の蛋白質を製造することができる。

公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下に記載された方法が挙げ

10 られる。

①M. Bodanszky 及び M. A. Ondetti、ペプチドシンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966 年)

②Schroeder 及び Luebke、ザペプチド (The peptide), Academic Press, New York

15 (1965 年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善 (株) (1975 年)

④矢島治明及び榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学 IV、205、(1977 年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発第 14 巻ペプチド合成 広川書店

20 また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の蛋白質を精製単離することができる。上記方法で得られる蛋白質が遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

25 以上のようにして得られた本発明の複合体及び／又は蛋白質は、可塑剤を定量的に測定する際の試薬として使用したり、種々の担体に固定化することにより可

塑剤を濃縮するためのアフィニティーカラムの製造などに利用することができる。
また、本発明の複合体及び／又は蛋白質に結合（即ち、交叉反応）する可塑剤を
同定することにより、本発明の複合体及び／又は蛋白質の適用範囲を拡大するこ
とができる。さらに、本発明は、本発明の複合体及び／又は蛋白質を含む、可塑
5 剤の測定又は定量用キット、可塑剤の濃縮用キットを提供する。

なお、上記キットでは、1種類の本発明の複合体及び／又は蛋白質のみを含ん
でいてもよいが、種類の異なる複数の本発明の複合体及び／又は蛋白質を含むこ
とができる。例えば、交叉反応性の異なる複数の複合体を含むキットを使用する
ことによって特定の可塑剤を特異的に測定・定量することができる。

- 10 本発明の複合体及び／又は蛋白質による可塑剤の測定法としては、放射性同位
元素免疫測定法（RIA法）、ELISA法（Engvall, E., Methods in
Enzymol., 70, 419-439 (1980)）、蛍光抗体法、プラーク法、スポット法、
凝集法、オクタロニー（Ouchterlony）等の一般に抗原の検出に使用されている
種々の方法（「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、株式会社R&Dブラ
15 ニング発行、第30頁-第53頁、昭和57年3月5日）が挙げられる。感度、
簡便性等の観点からELISA法が汎用される。

- また、本発明の複合体及び／又は蛋白質の固定化用担体としては、例えば、マ
イクロプレート（例、96ウェルマイクロプレート、24ウェルマイクロプレ
ート、192ウェルマイクロプレート、384ウェルマイクロプレートなど）、試
20 験管（例、ガラス試験管、プラスチック試験管）、ガラス粒子、ポリスチレン粒
子、修飾ポリスチレン粒子、ポリビニル粒子、ラテックス（例、ポリスチレン・
ラテックス）、ニトロセルロース膜、臭化シアン活性化濾紙、DBM活性化濾紙、
粒状固相（例、セファロース、セファデックス、アガロース、セルロース、セフ
アクリルなど）、鉄含有ポリカーボネート膜、マグネット含有ビーズなどが挙げ
25 られる。

本発明の複合体及び／又は蛋白質を担体に担持させるには、自体公知の方法

〔例、上記「エンザイムイムノアッセイ」第268～296頁、「アフィニティークロマトグラフィーハンドブック」（アマシャム ファルマシア バイオテック株式会社（1998年12月20日発行））〕などで担持できる。

また、本発明の免疫学的濃縮方法においては、大量の検体を、免疫吸着体カラムを通過させたり、免疫吸着体粒子と混合したりすることにより、抗原抗体反応を利用して、目的の環境ホルモン、その分解物又はそれらの混合物を、免疫吸着体に捕捉させ、ついで、pHの変更（pH2.5～3に下げる、pH11.5に上げるなど）、イオン強度の変更（1M NaClなど）、極性の変更（10%ジオキサン、50%エチレングリコール、3Mカオトロピック塩（SCN⁻、Cl₃COO⁻、I⁻）など）、蛋白変性剤（8M尿素、6M塩酸グアニジンなど）の添加や、電気泳動による解離など公知の方法で溶出させることにより、免疫学的に夾雑物の少ない目的物質を、数千から数万倍もの高倍率に濃縮できる。

これにより、環境中に極く微量しか存在しない環境ホルモン、その分解物又はそれらの混合物を、溶媒抽出法や固層抽出法などの従来の濃縮方法と比較して、はるかに高倍率に濃縮することができ、しかも定量を妨害する夾雑物等の含量の少ない濃縮液を得ることができる。

本明細書及び図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体がありうる場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸

cDNA : 相補的デオキシリボ核酸

25 a, A : アデニン

t, T : チミン

g, G : グアニン

c, C : シトシン

i, I : ヒポキサンチン (イノシン)

RNA : リボ核酸

5 mRNA : メッセンジャーリボ核酸

アミノ酸の略記

3文字 : 1文字 : 日本名

G l y : G : グリシン

A l a : A : アラニン

10 V a l : V : バリン

L e u : L : ロイシン

I l e : I : イソロイシン

S e r : S : セリン

T h r : T : スレオニン

15 C y s : C : システイン

M e t : M : メチオニン

G l u : E : グルタミン酸

A s p : D : アスパラギン酸

L y s : K : リジン

20 A r g : R : アルギニン

H i s : H : ヒスチジン

P h e : F : フェニルアラニン

T y r : Y : チロシン

T r p : W : トリプトファン

25 P r o : P : プロリン

A s n : N : アスパラギン

G l n : Q : グルタミン
 A s x : B : A s n + A s p
 G l x : Z : G l n + G l u

5 実施例

以下に実施例を挙げて、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[材料]

抗 DEHP 抗体 (DH-150) 産生ハイブリドーマ

- 10 抗 DEHP 抗体 (DH-150) (アイソタイプ $\gamma 2a$, κ) を産生するハイブリドーマ株、DH-150 は、Goda Y. et al.; 「Development of the ELISAs for Detection of Endocrine Disrupters」, Fifth International Symposium on Environmental Biotechnology (ISEB2000), Program/Abstracts, p.119 (2000) に発表した手順により作製した。本細胞は、10%ウシ胎児血清を含む RPMI1640 培地 (ハイブリド
- 15 ーマ用培地) (N. Kobayashi et al., J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 64, 171-177 (1998) 参照) を用いて継代培養した。

抗 DEHP 抗体 (DF-34) 産生ハイブリドーマ

- 抗 DEHP 抗体 (DF-34) を産生するハイブリドーマ株、DF-34 (FERM BP-6635) は、国際公開第 W099/43799 号パンフレットに記載されている。本細胞は、10%ウ
- 20 シ胎児血清を含む RPMI1640 培地 (ハイブリドーマ用培地) を用いて継代培養した。

プライマー

cDNA の合成及び PCR に用いたプライマーは、クラボウ又はエスペックオリゴサービスに化学合成とカートリッジ精製を依頼した。各プライマーの塩基配列を

- 25 表 1 に示す。

表 1. 実施例で用いたプライマー

プライマー名	塩基配列	
G2a-CH-1	5' GCTTGCCGGGTGGGCCAC 3'	(配列番号 1 0)
G2a-CH-2	5' ACACTGCTGGACAGGGAT 3'	(配列番号 1 1)
G2a-CH-3-XmaI	5' GGATCCCGGGAGTACCCCTTGACCAGGC 3'	(配列番号 1 2)
K-CH-1	5' GTTGAAGCTCTTGACAAT 3'	(配列番号 1 3)
K-CH-3-XmaI	5' GGATCCCGGGTGGATGGTGGGAAGATG 3'	(配列番号 1 4)
AAP	5' GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG 3'	(配列番号 1 5)
AUAP	5' GGCCACGCGTCGACTAGTAC 3'	(配列番号 1 6)
MKV-9	5' ACTAGTCGACATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG 3'	(配列番号 1 7)
KS-back	5' GGAAACAGCTATGACCATG 3'	(配列番号 1 8)
KS-for	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'	(配列番号 1 9)
DH-150-VH-5	5' ATTGTTATTACTCGCGGCCCAACCGGCCATGGCCGAGGTGCATCTGGT GGAGTCTGGG 3'	(配列番号 2 0)
DH-150-VH-3	5' CCGCCGGATCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTGAGGAGACGATG ACTGAGGTTCC 3'	(配列番号 2 1)
DH-150-VL-5	5' CAGGCGGAGGTGGATCCGGCGGTGGCGGATCGGATATCCAGATAACAC AGATTACA 3'	(配列番号 2 2)
DH-150-VL-3	5' GCTCAACTTTCTTGTCGACTTTATCATCATCATCTTTATAATCTTTCA GCTCCAGCGTGGTCCCTGC 3'	(配列番号 2 3)
G1-CH-1	5' GCTGGCCGGGTGGGCAAC 3'	(配列番号 2 8)
MKV-5	5' ACTAGTCGACATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTTC 3'	(配列番号 2 9)
DF-34-VH-5	5' ATTGTTATTACTCGCGGCCCAACCGGCCATGGCCGATGTACAACCTTCA GGAGTCAGGACC 3'	(配列番号 3 0)
DF-34-VH-3	5' CCGCCGGATCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTGAGGAGACGGTG ACTGAGGTTCCCT 3'	(配列番号 3 1)
DF-34-VL-5	5' CAGGCGGAGGTGGATCCGGCGGTGGCGGATCGCAGATTGTTCTCACCC AGTCTCC 3'	(配列番号 3 2)
DF-34-VL-3	5' GCTCAACTTTCTTGTCGACTTTATCATCATCATCTTTATAATCTTTTA TTTCCAACCTTTGTCCCCG 3'	(配列番号 3 3)

[実施例 1] 抗 DEHP 抗体 (DH-150) V_H 遺伝子のクローニング

ハイブリドーマ株 DH-150 (1×10^7 個) から、RNeasy mini キット (QIAGEN) を用いて全 RNA を抽出した。本 RNA ($4.2 \mu\text{g}$) に $\gamma 2a$ 鎖特異的プライマー (G2a-CH-1) 又は κ 鎖特異的プライマー (K-CH-1) 及び Superscript II

- 5 reverse transcriptase (Invitrogen) ($1 \mu\text{L}$) を添加し、添付の緩衝液中 ($25 \mu\text{L}$)、 42°C で 50 分間インキュベートした。 70°C で 15 分間インキュベートして酵素を失活させた後、粗反応液を GlassMAX spin cartridge (Invitrogen) を用いて精製し、 V_H 又は V_L 遺伝子を含む first strand cDNA (V_H -cDNA 及び V_L -cDNA) をそれぞれ得た。ついで V_H -cDNA を鋳型に用いる 5'-RACE [5' RACE system for
- 10 rapid amplification of cDNA ends, version 2.0 (Invitrogen)] により V_H ドメインの遺伝子断片を得た。すなわち cDNA 溶液 ($10 \mu\text{L}$) にデオキシシトシン三リン酸 (dCTP) (5 nmol)、terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT) ($1 \mu\text{L}$) を加え、TdT 緩衝液 ($25 \mu\text{L}$) 中、 37°C で 10 分間反応させた。ついで、ポリ C 配列と $\gamma 2a$ 鎖定常部に相補的なプライマー (各々 AAP、G2a-CH-2) (各 20
- 15 pmol) 及び Ex-Taq DNA polymerase (宝酒造) (1 U) を用いて Ex-Taq 緩衝液 ($40 \mu\text{L}$) 中で PCR [95°C 、1 分間; 64°C 、1 分間; 72°C 、2 分間 (35 サイクル)、次いで 72°C 、10 分間] を行った。さらに、本 PCR 反応液の 1000 倍希釈液 ($10 \mu\text{L}$) を鋳型として、プライマー AUAP 及び G2a-CH-3-XmaI (各 50 pmol) と Ex-Taq DNA polymerase (2.5 U) を用いる nested PCR (液量 $100 \mu\text{L}$) を同上の反
- 20 応条件で行った。得られた粗反応液を低融点アガロース (SeaPlaque; BMA) (2%) を用いる電気泳動 (TAE 緩衝液; 50 V) に付して、約 800 bp のバンドを QIAquick gel extraction kit (Qiagen) を用いて回収し、目的の V_H 遺伝子を含む DNA 断片 (V_H -DNA) を得た。

25 [実施例 2] 抗 DEHP 抗体 (DH-150) V_L 遺伝子のクローニング

上記の V_L -cDNA (1000 倍希釈液 $10 \mu\text{L}$) を鋳型として、既報のマウス可変部

遺伝子クローニング用のプライマー MKV-1~11 (S. T. Jones et al.,
Biotechnology, 9, 88-89 (1991) 参照) のいずれかと K-CH-3-XmaI (各 50
pmol) を組み合わせる PCR を試みた。本 PCR [95°C、1 分間; 50°C、1 分間;
72°C、3 分間 (35 サイクル)、次いで 72°C、10 分間] には Pfu DNA polymerase
5 (Promega) (3 U) を用い、Pfu 緩衝液中 (100 μ L) で反応を行った。粗反応液
の一部をアガロース電気泳動に付したところ、MKV-9 プライマーを用いる時に予
想されるサイズ (約 400 bp) のバンドが明瞭に観察された。そこで、残りの反
応液を上記の方法で精製し、目的の V_L 遺伝子を含む DNA 断片 (V_L -DNA) を得た。

10 [実施例 3] 抗 DEHP 抗体 (DH-150) V_H 及び V_L 遺伝子のサブクローニング

上述の V_H -DNA 及び V_L -DNA (計算値 各 1.5 μ g) にそれぞれ Xma I (40 U) を
加え、37°C で一夜インキュベートした。反応液をフェノール/クロロホルム/イソ
アミルアルコール (PCI) 抽出したのちエタノール沈殿を行い、得られた沈殿に
Sal I (40 U) を加えて再び 37°C で一夜インキュベートした。反応液を PCI 抽出
15 /エタノール沈殿に付したのち、上記のように低融点アガロースを用いる電気泳
動に付して目的の遺伝子断片を精製した。これら DNA (0.1 μ g) を、同様に Xma
I/Sal I 処理した pBluescript II ベクター (0.25 μ g) と混合し、T4 DNA リガ
ーゼ (New England Biolabs) (1600 U) を加えて 16°C で一夜インキュベートした。
反応液を PCI 抽出/エタノール沈殿に付して精製し、得られる組換えプラスミド
20 を XL1-Blue Subcloning-grade competent cells (Stratagene) に heat shock
法によりトランスフォーメーションした。トランスフォーメーション液をアンピ
シリンを含む 2xYT-agar プレートに塗布して 37°C で一夜インキュベートした。
得られた形質転換体クローン (V_H -DNA、 V_L -DNA 各々について 4 クローンずつ) を
任意に選択してアンピシリンを含む 2xYT 培地 (10 mL) 中で培養し、15%グリセ
25 ロール混合液としたのち -80°C で保存した。

[実施例 4] 抗 DEHP 抗体 (DH-150) V_H 及び V_L 遺伝子の塩基配列の決定

- 上記の形質転換クローンをアンピシリンを含む 2xYT 培地 (10 mL) 中で培養し、QIAGEN plasmid mini kit (Qiagen) を用いてプラスミドを抽出した。その一部 (0.5 又は 1.0 μ g) に、シークエンシング用プライマー (KS-back 又は KS-for; 各 1.8 pmol) を加え、Dual CyDye terminator sequencing kit (Amersham Biosciences) を用いて PCR 反応を行った。本 PCR では、95°C、20 秒間; 55°C、15 秒間; 70°C、60 秒間のサイクルを 35 回繰り返した。反応液をエタノール沈殿に付して増幅した DNA を回収し、本キットに添付された formamide loading dye (4 μ L) に溶解し、Long-Read Tower DNA シークエンサー (Amersham Biosciences) を用いて電気泳動 (6% ポリアクリルアミドゲル; TBE 緩衝液; 1500 V; 200 分間) を行った。得られた塩基配列データから、 V_H -DNA、 V_L -DNA 各々について 4 クローン間のコンセンサス配列を得た。このようにして得られた塩基配列並びに推定されるアミノ酸配列を図 1、2 (各々 V_H 及び V_L) に示す。この結果から、 V_H 及び V_L のサブグループは、Kabat の分類 ([Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition] U.S. Department of Health and Human Service, 1991 参照) に基づいて、各々 III(D)、V と決定した。また、Kabat のデータベース ([Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition] U.S. Department of Health and Human Service, 1991 参照) との比較から、 V_H 及び V_L における相補性決定領域 (complementarity-determining region; CDR) (抗原と直接相互作用し、親和力や特異性の発現に重要な役割を果たすアミノ酸配列) を特定した (図 1、2)。

[実施例 5] 抗 DEHP 抗体 (DH-150) scFv 遺伝子の構築

- 上記の遺伝子塩基配列の結果に基づいて V_H 、 V_L 遺伝子それぞれの 5' 末端、3' 末端に特異的なプライマー (DH-150-VH-5、DH-150-VH-3、DH-150-VL-5、DH-150-VL-3) (表 1) を設計し、実施例 1 で得られた first strand cDNA を鋳型として

PCRを行った。なお、DH-150-VH-5 プライマーには Nco I 認識配列を、DH-150-VH-3 プライマーには Sal I 認識配列及び FLAG 配列を導入した。また、DH-150-VH-3、DH-150-VL-5 の両プライマーには、 V_H と V_L を連結するためのリンカー配列 (Gly₄Ser)₃ (配列番号 5) をコードする塩基配列を付加した。先の cDNA 溶液の

5 1:1000 希釈液 (1 μ L) に DH-150-VH-5 及び DH-150-VH-3 プライマー (V_H の増幅) 又は、DH-150-VL-5 及び DH-150-VL-3 プライマー (V_L の増幅) (各 30 pmol) 並びに Ex-Taq DNA polymerase (2.5 U) を添加し、Ex-Taq 用緩衝液 (100 μ L) 中で PCR [95°C、1 分間; 50°C、1 分間; 72°C、3 分間 (35 サイクル)、次いで 72°C、10 分間] を行った。得られた粗反応液を上記の低融点アガロースを用い

10 る電気泳動に付して、約 400 bp のバンドを Wizard PCR preps DNA purification system (Promega) を用いて回収し、目的の V_H 遺伝子及び V_L 遺伝子断片を得た。引き続き、これら (各々 200 ng) を混合して Ex-Taq DNA polymerase (0.65 U) を加え、Ex-Taq 用緩衝液 (25 μ L) 中で overlap extension PCR [95°C、1 分間; 55°C、1 分間; 72°C、3 分間 (10 サイクル)、次

15 いで 72°C、10 分間] を行い、scFv 遺伝子を構築した。さらに本反応液の一部 (5 μ L) に DH-150-VH-5、DH-150-VL-3 プライマー (各 100 pmol)、Ex-Taq DNA polymerase (2.5 U) を添加し、同条件 (ただし反応液 100 μ L) で 25 サイクルの PCR を行って scFv 遺伝子を増幅した。得られた粗反応液を低融点アガロースによる電気泳動に付して、約 800 bp のバンドを回収し、5' V_H - リンカー - V_L

20 3' の配列を有する目的の scFv 遺伝子を得た (図 3)。

〔実施例 6〕 抗 DEHP 抗体 (DF-34) V_H および V_L 遺伝子のクローニング、サブクローニングおよび塩基配列の決定

ハイブリドーマ株 DF-34 (1 x 10⁷ 個) から、RNeasy mini キット (QIAGEN)

25 を用いて全 RNA を抽出した。本 RNA (4 μ g) に γ 1 鎖特異的プライマー (G1-CH-1) 又は κ 鎖特異的プライマー (K-CH-1) 及び Superscript II reverse

transcriptase (Invitrogen) (1 μ L) を添加し、添付の緩衝液中 (25 μ L) 、
42°C で 50 min インキュベートした。70°C で 15 min インキュベートして酵素を
失活させたのち粗反応液を GlassMAX spin cartridge (Invitrogen) を用いて精
製し、 V_H 又は V_L 遺伝子を含む first strand cDNA (V_H -cDNA 及び V_L -cDNA) をそ
5 れぞれ得た。以下、実施例 1 の手順に従って V_H -cDNA を鋳型に用いる 5'-RACE
を行い、目的の V_H 遺伝子を含む DNA 断片 (V_H -DNA) を得た。その一方で、上記の
 V_L -cDNA を鋳型として、実施例 2 に準じてプライマー 11 種 (MKV1~11) (S. T.
Jones et al., Biotechnology, 9, 88-89 (1991) 参照) のいずれかと K-CH-3-
XmaI (各 50 pmol) を組み合わせる PCR を試みた。粗反応液の一部をアガロース電
10 気泳動に付したところ、プライマー MKV-5 を用いる時に予想されるサイズ (約
400 bp) のバンドが明瞭に観察された。そこで、残りの反応液を上記の方法で精
製し、目的の V_L 遺伝子を含む DNA 断片 (V_L -DNA) を得た。

これら V_H -DNA 及び V_L -DNA (各 1.5 μ g) を実施例 3 に従って pBluescript II
ベクター にサブクローニングし、形質転換クローンを得た。これらのクローン
15 をアンピシリンを含む 2xYT 培地 (10 mL) 中で培養し、QIAGEN plasmid mini
kit (Qiagen) を用いてプラスミドを抽出した。その一部 (0.5 又は 1.0 μ g) を
用いて実施例 4 に従って V_H -DNA 及び V_L -DNA の塩基配列を決定し、アミノ酸配列
を推定した。その結果を図 4、5 (各々 V_H 及び V_L) に示す。この結果から、CDR の
アミノ酸配列を決定し、また V_H 及び V_L のサブグループを各々 $V_H = I(A)$ 、 $V_L = IV$
20 と同定した。

なお、DF-34 抗体と DH-150 抗体のシーケンスデータを比較したところ、図 6、
7 (各々 V_H 及び V_L) に示されるように両抗体の相同性は小さいことが判明した。

[実施例 7] 抗 DEHP 抗体 (DF-34) scFv 遺伝子の構築

25 上記の遺伝子塩基配列の結果に基づいて V_H 、 V_L 遺伝子それぞれの 5' 末端、
3' 末端に特異的なプライマー (DF-34-VH-5、DF-34-VH-3、DF-34-VL-5、DF-34-

VL-3) (表 1) を設計し、実施例 6 で得られた first strand cDNA を鋳型として、実施例 5 に準じて PCR を行った。なお、DF-34-VH-5 プライマーには *Nco* I 認識配列を、DF-34-VL-3 プライマーには *SaI* I 認識配列及び FLAG 配列を導入した。

また、DF-34-VH-3、DF-34-VL-5 の両プライマーには、 V_H と V_L を連結するための

- 5 リンカー配列 $(Gly_4Ser)_3$ をコードする塩基配列を付加した。得られた V_H および V_L 遺伝子フラグメント (各々 200 ng) を overlap extension PCR に付し、粗反応液を低融点アガロースによる電気泳動に付して、約 800 bp のバンドを回収し、目的の scFv 遺伝子断片を得た。

10 産業上の利用可能性

本発明により、抗可塑剤抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をコードする遺伝子のアミノ酸配列及び塩基配列が明らかとなった。本発明によって抗可塑剤抗体由来の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をコードする遺伝子を遺伝的に改変することが可能となる。例えば、改変遺伝子を宿主細胞内で発現させることにより、

- 15 可塑剤の測定・定量・濃縮において、より好ましい性質を持った、可塑剤に結合能を有する蛋白質を大量に得ることが可能となった。また、この改変抗体遺伝子を有する組換え微生物等を使用することにより、組換え蛋白質を効率よく生産することも可能となった。さらに、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をコードする塩基配列にランダムな変異を導入してミュータント scFv のライブラリーを構築し、
- 20 このライブラリー中から、可塑剤に対する親和性が元の抗体よりも大きい変異体を選択することにより、可塑剤に対する親和性が向上した組換え蛋白質を得ることが可能となった。以上により、性能の優れた酵素免疫測定法キットや抗体アフィニティーカラムをより安価に作製することが可能となった。

- 25 本出願は、2003年4月15日に日本で出願された特願2003-110877を基礎としており、その内容は本明細書中に援用される。

請求の範囲

1. 以下 (a) 又は (b) の蛋白質又はその塩：

(a) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列、配列番号 25 で表されるアミノ酸配列、若しくはこれらと実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質；

5 (b) 配列番号 4 で表わされるアミノ酸配列、配列番号 27 で表されるアミノ酸配列、若しくはこれらと実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質。

2. 以下 (a1) ～ (a4)、(b1) ～ (b4) のいずれかの蛋白質又はその塩：

(a1) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 4 又は
10 配列番号 27 で表されるアミノ酸配列と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質；

(a2) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 4 又は
15 配列番号 27 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質；

(a3) 配列番号 25 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 4 又は
20 は配列番号 27 で表されるアミノ酸配列と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質；

(a4) 配列番号 25 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 4 又は
25 は配列番号 27 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質；

(b 1) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 2 又は配列番号 2 5 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質；

- 5 (b 2) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 2 又は配列番号 2 5 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質；

- 10 (b 3) 配列番号 2 7 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 2 又は配列番号 2 5 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質；

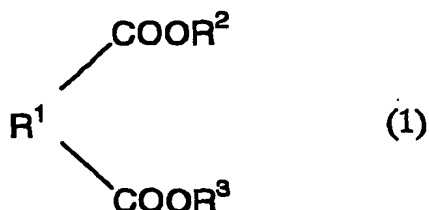
- (b 4) 配列番号 2 7 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 2 又は配列番号 2 5 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する蛋白質と複合体を形成したときに可塑剤に対して結合する蛋白質。
- 15

3. 以下 (a) 又は (b) の蛋白質又はその塩：

- 20 (a) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列、若しくはこれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号 4 で表わされるアミノ酸配列、若しくはこれと実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質、

4. 可塑剤が、式 (1)：



[式中、 R^1 は α -フェニレン、 R^2 及び R^3 は同一又は異なって、各々、H、炭素数1～20の直鎖又は分枝鎖アルキル、置換されていてもよいベンジル又は置換されていてもよいシクロヘキシルを意味する]で表される可塑剤である、請求

5 項2又は3記載の蛋白質。

5. 請求項1～4のいずれか1項記載の蛋白質を遺伝子組換えする方法。

6. 請求項5記載の方法により得られた蛋白質又はその塩。

7. 請求項1～4及び6のいずれか1項記載の蛋白質の部分ペプチド又はその塩。

8. 請求項1～4及び6のいずれか1項記載の蛋白質又はその部分ペプチドをコ

10 ードするポリヌクレオチド。

9. 請求項8記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

10. 請求項9記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

11. 請求項1～4及び6のいずれか1項記載の蛋白質又はその部分ペプチド或いはそれらの塩を産生せしめ、これを採取することを特徴とする、請求項1～4

15 及び6のいずれか1項記載の蛋白質又はその部分ペプチド或いはそれらの塩の製造法。

12. 以下(a)及び(b)が連結してなる複合体：

(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列、配列番号25で表されるアミノ酸配列、若しくはこれらと実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質；

20 (b) 配列番号4で表わされるアミノ酸配列、配列番号27で表されるアミノ酸配列、若しくはこれらと実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質。

13. 請求項12記載の複合体を使用することを特徴とする、該複合体に結合する可塑剤を同定する方法。

- 1 4. 請求項 1 2 記載の複合体を使用することを特徴とする、可塑剤の測定又は定量方法。
- 1 5. 請求項 1 2 記載の複合体を含む、可塑剤の測定又は定量用キット。
- 1 6. 請求項 1 2 記載の複合体を使用することを特徴とする、可塑剤の濃縮方法。
- 5 1 7. 請求項 1 2 記載の複合体を含む、可塑剤の濃縮用キット。

1/7

図 1

GAG GTG CAT CTG GTG GAG TCT GGG GGA GAC TTA GTG AGG CCT GGA
glu val his leu val glu ser gly gly asp leu val arg pro gly

GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC GGA
gly ser leu lys leu ser cys ala ala ser gly phe thr phe gly

CDR1

AGT TAT GGC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT GCA GAC AAG AGG CTG
ser tyr gly met ser trp val arg gln thr ala asp lys arg leu

CDR2

GAG TGG GTC GCA ACC ATT TAT AGT GGT GGT TTT TAC ACC TAC TAT
glu trp val ala thr ile tyr ser gly gly phe tyr thr tyr tyr

CCA GAC AGT GTG AGG GGA CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GTC
pro asp ser val arg gly arg phe thr ile ser arg asp asn val

AAG GAA ATC GTG TAT CTG CAA ATG AGC AGT CTG AAG TCT GAG GAC
lys glu ile val tyr leu gln met ser ser leu lys ser glu asp

CDR3

ACA GCC ATG TAT TAC TGT GCA AGA CGG ACG GTA GTA TCT ACG GAC
thr ala met tyr tyr cys ala arg arg thr val val ser thr asp

TAT ACT TTG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ATC GTC TCC
tyr thr leu asp tyr trp gly gln gly thr ser val ile val ser


TCA (配列番号1)

ser (配列番号2)


2/7

図 2

GAT ATC CAG ATA ACA CAG ATT ACA TCC TCC CTG GCT GCC TCT CTG
asp ile gln ile thr gln ile thr ser ser leu ala ala ser leu

GGA GAC AGA GTC ACC ATC AGT TGC  CDR1 CGG CCA AGT CAG GAC ATC AGC
gly asp arg val thr ile ser cys arg pro ser gln asp ile ser

AAT TTT TTA AAC TGG TTT CAG CAG AAA CCA GAT GGA ACT GTT GAA
asn phe leu asn trp phe gln gln lys pro asp gly thr val glu

GTC CTG ATC TGC  CDR2 ATG CAC TTA GGA GTC CCA TCA
val leu ile cys tyr thr leu arg met his leu gly val pro ser

ACG TTC AGT GGC TGT GTG TCT GGA ACA TAT TAT ACT CTC ACC AGT
thr phe ser gly cys val ser gly thr tyr tyr thr leu thr ser

AGC AAC CTG GAA CAA GAA GAT ATA GAC ACT TCC TTT GCC ATT AGG
ser asn leu glu gln glu asp ile asp thr ser phe ala ile arg

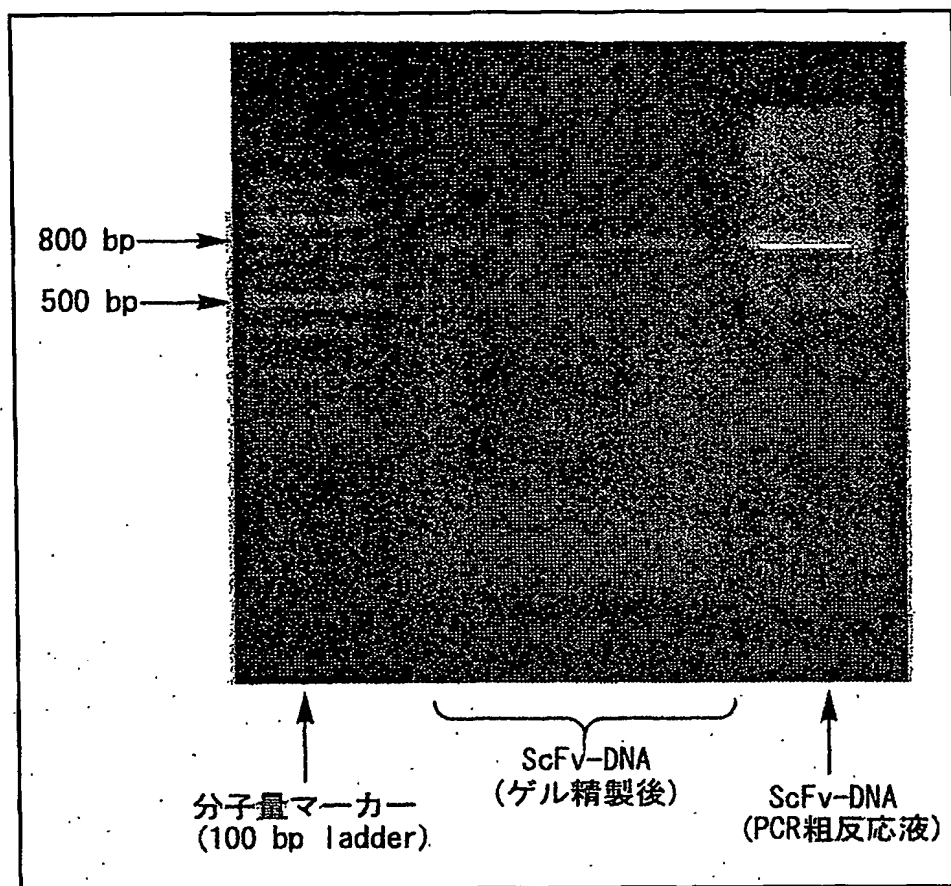
ATT ATA CGC GTG CTC ACG GTC GGT GCA GGG ACC ACG CTG GAG CTG
ile ile arg val leu thr val gly ala gly thr thr leu glu leu

AAA (配列番号3)

lys (配列番号4)

3/7

図 3



4/7

図 4

GAT GTA CAA CTT CAG GAG TCA GGA CCT GGC CTC GTG AAA CCT TCT
asp val gln leu gln glu ser gly pro gly leu val lys pro ser

GAG TCT CTG TCT CTC ACC TGT TCT GTC ACT GGC TAC TCC ATC ACC
glu ser leu ser leu thr cys ser val thr gly tyr ser ile thr

← CDR1 →
AGT GGT TAT TAC TGG AAT TGG ATC CGG CAA TTT CCA GGA AAC AAA
ser gly tyr tyr trp asn trp ile arg gln phe pro gly asn lys

← CDR2 →
CTG GAT TGG ATG GGC CAT ATA AGT TAC GAC GGT AAC AAT AAC TAC
leu asp trp met gly his ile ser tyr asp gly asn asn asn tyr

→
AAC CCA TCT CTC AAA AAT CGA ATC TCC ATC ACT CGT GAC ACA TCT
asn pro ser leu lys asn arg ile ser ile thr arg asp thr ser

AAG AAC CAG TTT TTC CTG AAG TTG AAT TCT GTG ACT ACT GAG GAC
lys asn gln phe phe leu lys leu asn ser val thr thr glu asp

← CDR3 →
ACA GAT ACA TAT TAC TGT TCT ATG ATC CTC TAT GGT ATG GAC TAC
thr asp thr tyr tyr cys ser met ile leu tyr gly met asp tyr

TGG GGT CAG GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA (配列番号 24)
trp gly gln gly thr ser val thr val ser ser (配列番号 25)

5/7

図 5

CAG ATT GTT CTC ACC CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CTA
gln ile val leu thr gln ser pro ala ile met ser ala ser leu

GGG GAA CGG GTC ACC ATG ACC TGC **ACT GCC AGC TCA AGT GTA AGT**
gly glu arg val thr met thr cys **thr ala ser ser ser val ser**

← CDR1

TCC AGT TAC TTG CAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCC CCC
ser ser tyr leu his trp tyr gln gln lys pro gly ser ser pro

AAA CTC TGC ATT TAT **AGC ACA TCC AAC CTG GCT TCT** GGA GTC CCA
lys leu cys ile tyr **ser thr ser asn leu ala ser** gly val pro

← CDR2

ACT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA
thr arg phe ser gly ser gly ser gly thr ser tyr ser leu thr

ATA AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC **CAC**
ile ser ser met glu ala glu asp ala ala thr tyr tyr cys **his**

CAG TAT CAT CGT TCC CCA CCC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG
gln tyr his arg ser pro pro thr phe gly ser gly thr lys leu

← CDR3

GAA ATA AAA (配列番号 26)

glu ile lys (配列番号 27)

6/7

図 6

DH-150 GAG GTG CAT CTG GTG GAG TCT GGG GGA GAC TTA GTG AGG CCT GGA
 DF-34 GAT GTA CAA CTT CAG GAG TCA GGA CCT GGC CTC GTG AAA CCT TCT
 glu val his leu val glu ser gly gly asp leu val arg pro gly
 asp val gln leu gln glu ser gly pro gly leu val lys pro ser

DH-150 GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC GGA
 DF-34 GAG TCT CTG TCT CTC ACC TGT TCT GTC ACT GGC TAC TCC ATC ACC
 gly ser leu lys leu ser cys ala ala ser gly phe thr phe gly
 glu ser leu ser leu thr cys ser val thr gly tyr ser ile thr

← CDR1 →

DH-150 AGT TAT GGC ATG TCT --- TGG GTT CGC CAG ACT GCA GAC AAG AGG
 DF-34 AGT GGT TAT TAC TGG AAT TGG ATC CGG CAA TTT CCA GGA AAC AAA
 ser tyr gly met ser --- trp val arg gln thr ala asp lys arg
 ser gly tyr tyr trp asn trp ile arg gln phe pro gly asn lys

← CDR2 →

DH-150 CTG GAG TGG GTC GCA ACC ATT TAT AGT GGT GGT TTT TAC ACC TAC
 DF-34 CTG GAT TGG ATG GGC CAT ATA AGT --- TAC GAC GGT AAC AAT AAC
 leu glu trp val ala thr ile tyr ser gly gly phe tyr thr tyr
 leu asp trp met gly his ile ser --- tyr asp gly asn asn asn

→

DH-150 TAT CCA GAC AGT GTG AGG GGA CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT
 DF-34 TAC AAC CCA TCT CTC AAA AAT CGA ATC TCC ATC ACT CGT GAC ACA
 tyr pro asp ser val arg gly arg phe thr ile ser arg asp asn
 tyr asn pro ser leu lys asn arg ile ser ile thr arg asp thr

DH-150 GTC AAG GAA ATC GTG TAT CTG CAA ATG AGC AGT CTG AAG TCT GAG
 DF-34 TCT AAG AAC CAG TTT TTC CTG AAG TTG AAT TCT GTG ACT ACT GAG
 val lys glu ile val tyr leu gln met ser ser leu lys ser glu
 ser lys asn gln phe phe leu lys leu asn ser val thr thr glu

← CDR3 →

DH-150 GAC ACA GCC ATG TAT TAC TGT GCA AGA CGG ACG GTA GTA TCT ACG
 DF-34 GAC ACA GAT ACA TAT TAC TGT TCT ATG ATC CTC TAT GGT --- ---
 asp thr ala met tyr tyr cys ala arg arg thr val val ser thr
 asp thr asp thr tyr tyr cys ser met ile leu tyr gly --- ---

→

DH-150 GAC TAT ACT TTG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ATC GTC
 DF-34 --- --- --- ATG GAC TAC TGG GGT CAG GGA ACC TCA GTC ACC GTC
 asp tyr thr leu asp tyr trp gly gln gly thr ser val ile val
 --- --- --- met asp tyr trp gly gln gly thr ser val thr val

DH-150 TCC TCA (配列番号1)
 DF-34 TCC TCA (配列番号24)
 ser ser (配列番号2)
 ser ser (配列番号25)

图 7

DH-150	GAT	ATC	CAG	ATA	ACA	CAG	ATT	ACA	TCC	TCC	CTG	GCT	GCC	TCT	CTG
DF-34	CAG	ATT	GTT	CTC	ACC	CAG	TCT	CCA	GCA	ATC	ATG	TCT	GCA	TCT	CTA
	asp	ile	gln	ile	thr	gln	ile	thr	ser	ser	leu	ala	ala	ser	leu
	gln	ile	val	leu	thr	gln	ser	pro	ala	ile	met	ser	ala	ser	leu

CDR1

DH-150 GGA GAC AGA GTC ACC ATC AGT TGC CGG CCA AGT CAG --- GAC ATC
 DF-34 GGG GAA CGG GTC ACC ATG ACC TGC ACT GCC AGC TCA AGT GTA AGT
 gly asp arg val thr ile ser cys arg pro ser gln --- asp ile
 gly glu arg val thr met thr cys thr ala ser ser ser val ser

DH-150	AGC	AAT	TTT	TTA	AAC	TGG	TTT	CAG	CAG	AAA	CCA	GAT	GGA	ACT	GTT
DF-34	TCC	AGT	TAC	TTG	CAC	TGG	TAC	CAG	CAG	AAG	CCA	GGA	TCC	TCC	CCC
	ser	asn	phe	leu	asn	trp	phe	gln	gln	lys	pro	asp	gly	thr	val
	ser	ser	tyr	leu	his	trp	tyr	gln	gln	lys	pro	gly	ser	ser	pro

CDR2

DH-150	GAA	GTC	CTG	ATC	TGC	TAC	ACA	TTA	AGA	ATG	CAC	TTA	GGA	GTC	CCA
DF-34	AAA	CTC	TGC	ATT	TAT	AGC	ACA	TCC	AAC	CTG	GCT	TCT	GGA	GTC	CCA
	glu	val	leu	ile	cys	tyr	thr	leu	arg	met	his	leu	gly	val	pro
	lys	leu	cys	ile	tyr	ser	thr	ser	asn	leu	ala	ser	gly	val	pro

DH-150 TCA ACG TTC AGT GGC TGT GTG TCT GGA ACA TAT TAT ACT CTC ACC
 DF-34 ACT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA
 ser thr phe ser gly cys val ser gly thr tyr tyr thr leu thr
 thr arg phe ser gly ser gly ser gly thr ser tyr ser leu thr

DH-150 AGT AGC AAC CTG GAA CAA GAA GAT ATA GAC ACT TCC TTT GCC ATT
DF-34 ATA AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAC
ser ser asn leu glu gln glu asp ile asp thr ser phe ala ile
ile ser ser met glu ala glu asp ala ala thr tyr tyr cys his

CDR3

DH-150	AGG	ATT	ATA	CGC	GTG	---	CTC	ACG	GTC	GGT	GCA	GGG	ACC	ACG	CTG
DF-34	CAG	TAT	CAT	CGT	TCC	CCA	CCC	ACG	TTC	GGC	TCG	GGG	ACA	AAG	TTG
	arg	ile	ile	arg	val	---	leu	thr	val	gly	ala	gly	thr	thr	leu
	gln	tyr	his	arg	ser	pro	pro	thr	phe	gly	ser	gly	thr	lys	leu

DH-150	GAG CTG AAA	(配列番号3)
DF-34	GAA ATA AAA	(配列番号26)
	glu leu lys	(配列番号4)
	glu ile lys	(配列番号27)

SEQUENCE LISTING

<110> Japan EnviroChemicals, Ltd.

<120> A protein binding to plasticizers

<130> 09622

<150> JP 2003-110877

<151> 2003-4-15

<160> 27

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 363

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (363)

<223>

<400> 1

2/24

gag gtg cat ctg gtg gag tct ggg gga gac tta gtg agg cct gga ggg 48

Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Arg Pro Gly Gly

1

5

10

15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc gga agt tat 96

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser Tyr

20

25

30

ggc atg tct tgg gtt cgc cag act gca gac aag agg ctg gag tgg gtc 144

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Ala Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val

35

40

45

gca acc att tat agt ggt ggt ttt tac acc tac tat cca gac agt gtg 192

Ala Thr Ile Tyr Ser Gly Gly Phe Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50

55

60

agg gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gtc aag gaa atc gtg tat 240

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Glu Ile Val Tyr

65

70

75

80

ctg caa atg agc agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg tat tac tgt 288

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85

90

95

gca aga cgg acg gta gta tct acg gac tat act ttg gac tac tgg ggt 336

Ala Arg Arg Thr Val Val Ser Thr Asp Tyr Thr Leu Asp Tyr Trp Gly

3/24

100

105

110

caa gga acc tca gtc atc gtc tcc tca

363

Gln Gly Thr Ser Val Ile Val Ser Ser

115

120

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Arg Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser Tyr

20

25

30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Ala Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ala Thr Ile Tyr Ser Gly Gly Phe Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50

55

60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Glu Ile Val Tyr

65

70

75

80

4/24

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Arg Thr Val Val Ser Thr Asp Tyr Thr Leu Asp Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Ser Val Ile Val Ser Ser

115

120

<210> 3

<211> 318

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(318)

<223>

<400> 3

gat atc cag ata aca cag att aca tcc tcc ctg gct gcc tct ctg gga

48

Asp Ile Gln Ile Thr Gln Ile Thr Ser Ser Leu Ala Ala Ser Leu Gly

1

5

10

15

gac aga gtc acc atc agt tgc cga agt cag gac atc agc aat ttt

96

5/24

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Pro Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe

20

25

30

tta aac tgg ttt cag cag aaa cca gat gga act gtt gaa gtc ctg atc 144

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Glu Val Leu Ile

35

40

45

tgc tac aca tta aga atg cac tta gga gtc cca tca acg ttc agt ggc 192

Cys Tyr Thr Leu Arg Met His Leu Gly Val Pro Ser Thr Phe Ser Gly

50

55

60

tgt gtg tct gga aca tat tat act ctc acc agt agc aac ctg gaa caa 240

Cys Val Ser Gly Thr Tyr Tyr Thr Leu Thr Ser Ser Asn Leu Glu Gln

65

70

75

80

gaa gat ata gac act tcc ttt gcc att agg att ata cgc gtg ctc acg 288

Glu Asp Ile Asp Thr Ser Phe Ala Ile Arg Ile Ile Arg Val Leu Thr

85

90

95

gtc ggt gca ggg acc acg ctg gag ctg aaa 318

Val Gly Ala Gly Thr Thr Leu Glu Leu Lys

100

105

<210> 4

<211> 106

<212> PRT

6/24

<213> Mus musculus

<400> 4

Asp Ile Gln Ile Thr Gln Ile Thr Ser Ser Leu Ala Ala Ser Leu Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Pro Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe

20

25

30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Glu Val Leu Ile

35

40

45

Cys Tyr Thr Leu Arg Met His Leu Gly Val Pro Ser Thr Phe Ser Gly

50

55

60

Cys Val Ser Gly Thr Tyr Tyr Thr Leu Thr Ser Ser Asn Leu Glu Gln

65

70

75

80

Glu Asp Ile Asp Thr Ser Phe Ala Ile Arg Ile Ile Arg Val Leu Thr

85

90

95

Val Gly Ala Gly Thr Thr Leu Glu Leu Lys

100

105

<210> 5

<211> 5

7/24

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Linker

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

10

15

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Linker

<400> 6

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly

1

5

10

<210> 7

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

8/24

<220>

<223> Linker

<400> 7

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Ser Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Linker

<400> 8

Gly Ser Thr Ser Gly Lys Pro Ser Glu Gly Lys Gly

1 5 10

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

9/24

<213> Artificial

<220>

<223> Linker

<400> 9

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1

5

10

15

Lys Gly

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 10

gcttgccggg tgggccac

18

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

10/24

<223> Primer

<400> 11

acactgctgg acagggat

18

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 12

ggatcccggg agtaccctt gaccaggc

28

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 13

gttgaagctc ttgacaat

18

11/24

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 14

ggatcccggtggatgggtgggaagatg

27

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> 24

<223> i

<220>

12/24

<221> misc_feature

<222> 25

<223> i

<220>

<221> misc_feature

<222> 29

<223> i

<220>

<221> misc_feature

<222> 30

<223> i

<220>

<221> misc_feature

<222> 34

<223> i

<220>

<221> misc_feature

<222> 35

<223> i

<400> 15

ggccacgcgt cgactagtac gggnnngggnn gggngng

13/24

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 16

ggccacgcgt cgactagtac

20

<210> 17

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 17

actagtcgac atggtrtcw casctcagtt ccttg

35

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 18

ggaaacagct atgaccatg

19

<210> 19

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 19

gtaaaacgac ggccagt

17

<210> 20

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

15/24

<400> 20

attgttatta ctgcggccc aaccggccat ggccgagtg catctggtgg agtctggg . 58

<210> 21

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 21

ccgccggatc cacctccgcc tgaaccgct ccacctgagg agacgatgac tgaggttcc 59

<210> 22

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 22

caggcggagg tggatccggc ggtggcggat cggatatcca gataacacag attaca 56

16/24

<210> 23

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 23

gctcaacttt ctgtcgact ttatcatcat catctttata atctttcagc tccagcgtgg 60

tccctgc 67

<210> 24

<211> 348

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(348)

<400> 24

gat gta caa ctt cag gag tca gga cct ggc ctc gtg aaa cct tct gag 48

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1

5

10

15

17/24

tct ctg tct ctc acc tgt tct gtc act ggc tac tcc atc acc agt ggt	96
Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly	
20 25 30	
tat tac tgg aat tgg atc cgg caa ttt cca gga aac aaa ctg gat tgg	144
Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Asp Trp	
35 40 45	
atg ggc cat ata agt tac gac ggt aac aat aac tac aac cca tct ctc	192
Met Gly His Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu	
50 55 60	
aaa aat cga atc tcc atc act cgt gac aca tct aag aac cag ttt ttc	240
Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe	
65 70 75 80	
ctg aag ttg aat tct gtg act act gag gac aca gat aca tat tac tgt	288
Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Asp Thr Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
tct atg atc ctc tat ggt atg gac tac tgg ggt cag gga acc tca gtc	336
Ser Met Ile Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val	
100 105 110	
acc gtc tcc tca	348

18/24

Thr Val Ser Ser

115

<210> 25

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly

20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Asp Trp

35 40 45

Met Gly His Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe

65 70 75 80

Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Asp Thr Tyr Tyr Cys

85 90 95

19/24

Ser Met Ile Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val

100

105

110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 26

<211> 324

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 26

cag att gtt ctc acc cag tct cca gca atc atg tct gca tct cta ggg 48

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly

1

5

10

15

gaa cgg gtc acc atg acc tgc act gcc agc tca agt gta agt tcc agt 96

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20

25

30

tac ttg cac tgg tac cag cag aag cca gga tcc tcc ccc aaa ctc tgc 144

20/24

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Cys

35

40

45

att tat agc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cca act cgc ttc agt 192

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser

50

55

60

ggc agt ggg tct ggg acc tct tac tct ctc aca ata agc agc atg gag 240

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu

65

70

75

80

gct gaa gat gct gcc act tat tac tgc cac cag tat cat cgt tcc cca 288

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro

85

90

95

ccc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa 324

Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

21/24

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly

1

5

10

15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20

25

30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Cys

35

40

45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser

50

55

60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu

65

70

75

80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro

85

90

95

Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

22/24

<220>

<223> Primer

<400> 28

gctggccggg tgggcaac

18

<210> 29

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 29

actagtcgac atggatttgc aggtgcagat twtcagcttc

40

<210> 30

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 30

23/24

attgttatta ctgcggccc aaccggccat ggccgatgta caacttcagg agtcaggacc 60

<210> 31

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 31

ccgccggatc cacctccgcc tgaaccgcct ccacctgagg agacggtgac tgaggttccc 60

t

61

<210> 32

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 32

caggcggagg tggatccggc ggtggcggat cgcagattgt tctcaccag tctcc 55

24/24

<210> 33

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 33

gctcaacttt cttgtcgact ttatcatcat catctttata atcttttatt tccaactttg 60

tccccg 66

<210> 34

<211> 66

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 34

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005250

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K16/44, C12P21/02, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K16/44, C12P21/02, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Shigeru FUJIMOTO et al., "ELISA-ho o Mochiita Kanben na Naibunpitsu Kakuran Kagaku Busshitsu Sokuteiho", Japanese Journal of Clinical Medicine, 2000, Vol.58, No.12, pages 2491 to 2494	1-17
X	WO 99/43799 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 02 September, 1999 (02.09.99), & EP 1057890 A1 & JP 2000-533539 A & US 2003/0087324 A1	1-2, 4-17
A	Gavilondo-Cowley J.V. et al., Specific amplification of rearranged immunoglobulin variable region genes from mouse hybridoma cells, Hybridoma, 1990, Vol.9, No.5, pages 407 to 417	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 May, 2004 (28.05.04)

Date of mailing of the international search report

15 June, 2004 (15.06.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 C12N15/09, C07K16/44, C12P21/02, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 C12N15/09, C07K16/44, C12P21/02, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI(DIALOG), MEDLINE(STN), JSTPlus/JST7580(JOIS),
SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	藤本茂他, ELISA法を用いた簡便な内分泌攪乱化学物質測定法, 日本臨床, 2000, Vol. 58, No. 12, pp. 2491-2494	1-17
X	WO 99/43799 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 1999.09.02 & EP 1057890 A1 & JP 2000-533539 A & US 2003/0087324 A1	1-2, 4-17
A	Gavilondo-Cowley J.V. et al., Specific amplification of rearranged immunoglobulin variable region genes from mouse hybridoma cells, Hybridoma, 1990, Vol. 9, No. 5, pp. 407-417	1-17

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.05.2004

国際調査報告の発送日

15.6.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

七條 里美

4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448